


Patent Document

Patent	JP2008067616A2 View Image Send to Project
Patent Evaluation	Registered Patents only
Issued	March 27, 2008
Title	ACTIVATOR FOR α 1 INTEGRIN
Applicant	<u>TOKYO UNIV OF SCIENCE</u>
Abstract	<p>Problem to be solved: To provide a peptide, polynucleotide, recombinant vector, cell and virus having α1 integrin-activating action as well as a medicine such as a α1 integrin-activating agent containing the same as an active ingredient, and an agent for enhancing cell adhesion to extracellular matrix by activating α1 integrin.</p> <p>Solution: Disclosed is a peptide comprising a specific amino acid sequence and having α1 integrin-activating action. The peptide and a polynucleotide encoding the peptide, etc., are useful for a α1 integrin-activating agent, a cell adhesion enhancer, a wound-repairing agent, a differentiation inhibitor of adipose cell, an obese-preventing agent, an obese inhibitor, a cell death inducer, an anticancer agent or the like.</p>
 Points	Show Points
Inventor	FUKAI FUMIO
Appl. No.	2006247256 (9/12/2006)
IPC	<u>C12N-015/09;</u> <u>A61K-038/00; A61K-048/00; A61K-035/76; A61P-043/00; A61P-017/02; A61P-003/04; A61P-035/00; A61K-</u> <u>038/17; C07K-014/47; C12N-001/15; C12N-001/19; C12N-001/21; C12N-005/10; C12N-007/00;</u>
Family	Show Known Family Members (1 patent(s))
Legal Status	Show Legal Status / Legal Status of Family Members

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-67616

(P2008-67616A)

(43) 公開日 平成20年3月27日(2008.3.27)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 B 0 6 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 7
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 7	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 24 O L (全 16 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-247256 (P2006-247256)
(22) 出願日 平成18年9月12日 (2006.9.12)

(71) 出願人 803000115
学校法人東京理科大学
東京都新宿区神楽坂一丁目3番地
(74) 代理人 110000176
一色国際特許業務法人
(72) 発明者 深井 文雄
東京都新宿区神楽坂1-3 学校法人東京
理科大学内
Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA05 DA02 EA04
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02
CA24 CA44
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08
BA18 BA23 BA44 DC50 ZA70
ZA89 ZB21 ZB22 ZB26

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 β 1 インテグリン活性化剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 β 1 インテグリン活性化作用を有するペプチド、ポリヌクレオチド、組換えペクター、細胞、及びウイルス、並びに、これらを有効成分として含有する、 β 1 インテグリンを活性化する薬剤、 β 1 インテグリンを活性化することにより、細胞外マトリックスに対する細胞接着を増強する薬剤等の薬剤を提供する。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列からなり、 β 1 インテグリンを活性化する作用を有するペプチド。該ペプチドやそれをコードするポリヌクレオチド等は、 β 1 インテグリン活性化剤、細胞接着増強剤、傷修復剤、脂肪細胞分化抑制剤、肥満予防剤、肥満抑制剤、細胞死誘導剤、及び抗腫瘍剤等に有用である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチド（但し、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するペプチドを除く。）。

【請求項2】

配列番号3～8のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するペプチド。

【請求項3】

配列番号10～15のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項4】

請求項1～3のいずれかに記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド、又はその塩基配列に相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド。

【請求項5】

請求項4に記載のポリヌクレオチドを有する組換えベクター。

【請求項6】

請求項5に記載の組換えベクターが導入され、請求項1～3のいずれかに記載のペプチドを分泌する細胞。

【請求項7】

請求項5に記載の組換えベクターが導入され、細胞に感染することにより請求項1～3のいずれかに記載のペプチドを前記細胞に分泌させるウイルス。

【請求項8】

請求項1～3のいずれかに記載のペプチド、請求項4に記載のポリヌクレオチド、請求項5に記載の組換えベクター、請求項6に記載の細胞、及び請求項7に記載のウイルスからなるグループから選ばれる物質を1又は2以上有効成分として含有する β 1インテグリン活性化剤。

【請求項9】

β 1インテグリンを活性化することにより、細胞外マトリックスに対する細胞接着を増強する細胞接着増強剤であって、

請求項1～3のいずれかに記載のペプチド、請求項4に記載のポリヌクレオチド、請求項5に記載の組換えベクター、請求項6に記載の細胞、及び請求項7に記載のウイルスからなるグループから選ばれる物質を1又は2以上有効成分として含有する細胞接着増強剤。

【請求項10】

請求項1～3のいずれかに記載のペプチド、請求項4に記載のポリヌクレオチド、請求項5に記載の組換えベクター、請求項6に記載の細胞、及び請求項7に記載のウイルスからなるグループから選ばれる物質を1又は2以上有効成分として含有する外傷修復剤。

【請求項11】

請求項1～3のいずれかに記載のペプチド、請求項4に記載のポリヌクレオチド、請求項5に記載の組換えベクター、請求項6に記載の細胞、及び請求項7に記載のウイルスからなるグループから選ばれる物質を1又は2以上有効成分として含有する脂肪細胞分化抑制剤。

【請求項12】

請求項1～3のいずれかに記載のペプチド、請求項4に記載のポリヌクレオチド、請求項5に記載の組換えベクター、請求項6に記載の細胞、及び請求項7に記載のウイルスからなるグループから選ばれる物質を1又は2以上有効成分として含有する肥満予防剤又は肥満抑制剤。

【請求項13】

浮遊性腫瘍細胞に対して細胞死を誘導する細胞死誘導剤であって、

請求項1～3のいずれかに記載のペプチド、請求項4に記載のポリヌクレオチド、請求項5に記載の組換えベクター、請求項6に記載の細胞、及び請求項7に記載のウイルスか

らなるグループから選ばれる物質を1又は2以上有効成分として含有する細胞死誘導剤。

【請求項14】

Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を有するペプチドをさらに含有することを特徴とする請求項13に記載の細胞死誘導剤。

【請求項15】

配列番号21に示されるアミノ酸配列を有するペプチドをさらに含有することを特徴とする請求項13に記載の細胞死誘導剤。

【請求項16】

細胞外マトリックスをさらに含有することを特徴とする請求項13に記載の細胞死誘導剤。

【請求項17】

フィブロネクチンまたは多量体フィブロネクチンをさらに含有することを特徴とする請求項13に記載の細胞死誘導剤。

【請求項18】

浮遊性腫瘍細胞に起因する腫瘍に対する抗腫瘍剤であって、

請求項1～3のいずれかに記載のペプチド、請求項4に記載のポリヌクレオチド、請求項5に記載の組換えベクター、請求項6に記載の細胞、及び請求項7に記載のウイルスからなるグループから選ばれる物質を1又は2以上有効成分として含有する抗腫瘍剤。

【請求項19】

Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を有するペプチドをさらに含有することを特徴とする請求項18に記載の抗腫瘍剤。

【請求項20】

配列番号21に示されるアミノ酸配列を有するペプチドをさらに含有することを特徴とする請求項18に記載の抗腫瘍剤。

【請求項21】

細胞外マトリックスをさらに含有することを特徴とする請求項18に記載の抗腫瘍剤。

【請求項22】

フィブロネクチンまたは多量体フィブロネクチンをさらに含有することを特徴とする請求項18に記載の抗腫瘍剤。

【請求項23】

浮遊性腫瘍細胞に対して細胞死を誘導する細胞死誘導剤であって、

多量体フィブロネクチンを有効成分として含有する細胞死誘導剤。

【請求項24】

浮遊性腫瘍細胞に起因する腫瘍に対する抗腫瘍剤であって、

多量体フィブロネクチンを有効成分として含有する抗腫瘍剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、 β 1インテグリン活性化作用を有するペプチド、ポリヌクレオチド、組換えベクター、細胞、及びウイルス、並びに、これらを有効成分として含有する、 β 1インテグリンを活性化する薬剤、 β 1インテグリンを活性化することにより、細胞外マトリックスに対する細胞接着を増強する薬剤、傷修復剤、脂肪細胞分化抑制剤、肥満予防剤、肥満抑制剤、細胞死誘導剤、及び抗腫瘍剤、並びに、多量体フィブロネクチンを有効成分として含有する細胞死誘導剤及び抗腫瘍剤に関する。

【背景技術】

【0002】

β 1インテグリンを活性化する作用を有する物質として、従来、ヒト由来のテネシンC (GenBank Accession No. NP_002151) の1231～1236番目のアミノ酸配列を有するペプチド、例えば、ヒト由来のテネシンC (GenBank Accession No. NP_002151) の1218～1238番目のアミノ酸配列からなるペプチドが知られているが、このような β 1インテグリンを活性化するペプチドは、 β 1インテグリンを介して細胞が細胞外マトリックス (ECM)

に接着する細胞接着の増強、細胞伸展の促進、創傷の治癒、術後組織の修復、肥満の改善、がん治療、感染症治療、骨髄抑制等の免疫抑制状態の治療、エリスロジェネシスなどに有用であることが報告されている（例えば、特許文献1及び非特許文献1など参照）。

【特許文献1】特開2001-213898号公報

【非特許文献1】Biochemistry 2002, 41, 3270-3277

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明は、 β 1インテグリン活性化作用を有するペプチド、ポリヌクレオチド、組換えベクター、細胞、及びウイルス、並びに、これらを有効成分として含有する、 β 1インテグリンを活性化する薬剤、 β 1インテグリンを活性化することにより、細胞外マトリックスに対する細胞接着を増強する薬剤、傷修復剤、脂肪細胞分化抑制剤、肥満予防剤、肥満抑制剤、細胞死誘導剤、及び抗腫瘍剤、並びに、多量体フィブロネクチンを有効成分として含有する細胞死誘導剤及び抗腫瘍剤等を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者は、配列番号10～20に示されるアミノ酸配列からなるペプチドのうち、配列番号10～15に示されるアミノ酸配列からなるペプチドが、ヒト由来のテネシンC（GenBank Accession No. NP_002151）の1218～1238番目のアミノ酸配列からなるペプチド（以下「TNIIIA2」と称する。配列番号2参照）のC末端にシステイン（C）を付加したペプチド（配列番号9参照）と同様に β 1インテグリンを活性化し、配列番号16～20に示されるアミノ酸配列からなるペプチドは、 β 1インテグリンを活性化できないことを見出した。

【0005】

また、本発明者は、配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるペプチドが、浮遊性腫瘍細胞に対して細胞死を誘導する作用を有することを見出した。

【0006】

さらに、本発明者は、配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるペプチドを、配列番号21に示されるアミノ酸配列からなるペプチドを8分子櫛形に結合したMAP（以下、「(RGD)₈」）と称する。）、あるいは、フィブロネクチン（特に、多量体フィブロネクチン）とともに浮遊性腫瘍細胞に作用させることにより細胞死を効率よく誘導できることを見出した。

【0007】

また、本発明者は、多量体フィブロネクチンが、浮遊性腫瘍細胞に対して細胞死を誘導する作用を有することを見出した。このようにして、本発明者は本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明に係るペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する。但し、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するペプチドを除く。なお、本発明に係るペプチドは、例えば、配列番号3～8のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号10～15のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチド等である。

【0009】

本発明に係るポリヌクレオチドは、上記ペプチドをコードするポリヌクレオチド、又はその塩基配列に相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドである。

【0010】

本発明に係る組換えベクターは、上記ポリヌクレオチドを有する。

【0011】

本発明に係る細胞は、上記組換えベクターが導入されており、上記ペプチドを分泌する。

【0012】

本発明に係るウイルスは、上記組換えベクターが導入されており、細胞に感染することにより上記ペプチドを前記細胞に分泌させる。

【0013】

本発明に係る β 1インテグリン活性化剤は、上記ペプチド、ポリヌクレオチド、組換えベクター、細胞、及びウイルスからなるグループから選ばれる物質を1又は2以上有効成分として含有する。

【0014】

また、本発明に係る細胞接着増強剤は、 β 1インテグリンを活性化することにより、細胞外マトリックスに対する細胞接着を増強する薬剤であって、上記ペプチド、ポリヌクレオチド、組換えベクター、細胞、及びウイルスからなるグループから選ばれる物質を1又は2以上有効成分として含有する。

【0015】

さらに、本発明に係る外傷修復剤は、上記ペプチド、ポリヌクレオチド、組換えベクター、細胞、及びウイルスからなるグループから選ばれる物質を1又は2以上有効成分として含有する。

【0016】

本発明に係る脂肪細胞分化抑制剤は、上記ペプチド、ポリヌクレオチド、組換えベクター、細胞、及びウイルスからなるグループから選ばれる物質を1又は2以上有効成分として含有する。

【0017】

また、本発明に係る肥満予防剤及び肥満抑制剤は、上記ペプチド、ポリヌクレオチド、組換えベクター、細胞、及びウイルスからなるグループから選ばれる物質を1又は2以上有効成分として含有する。

【0018】

本発明に係る細胞死誘導剤は、浮遊性腫瘍細胞に対して細胞死を誘導する薬剤であって、上記ペプチド、ポリヌクレオチド、組換えベクター、細胞、及びウイルスからなるグループから選ばれる物質を1又は2以上有効成分として含有する。本発明に係る細胞死誘導剤は、Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を有するペプチド（例えば、配列番号21に示されるアミノ酸配列を有するペプチド等）、細胞外マトリックス（例えば、フィブロネクチン等）などをさらに含んでもよい。また、本発明に係る細胞死誘導剤は、多量体フィブロネクチンをさらに含んでもよい。

【0019】

本発明に係る抗腫瘍剤は、浮遊性腫瘍細胞に起因する腫瘍に対する薬剤であって、上記ペプチド、ポリヌクレオチド、組換えベクター、細胞、及びウイルスからなるグループから選ばれる物質を1又は2以上有効成分として含有する。本発明に係る抗腫瘍剤は、Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を有するペプチド（例えば、配列番号21に示されるアミノ酸配列を有するペプチド等）、細胞外マトリックス（例えば、フィブロネクチン等）などをさらに含んでもよい。また、本発明に係る抗腫瘍剤は、多量体フィブロネクチンをさらに含んでもよい。

【0020】

本発明に係る細胞死誘導剤は、浮遊性腫瘍細胞に対して細胞死を誘導する薬剤であって、多量体フィブロネクチンを有効成分として含有する。

【0021】

また、本発明に係る抗腫瘍剤は、浮遊性腫瘍細胞に起因する腫瘍に対する薬剤であって、多量体フィブロネクチンを有効成分として含有する。

【0022】

なお、本願明細書において「腫瘍細胞に作用させる」とは、上述のペプチド、ポリヌクレオチド、組換えベクター、細胞、ウイルスなどを、添加又は投与することにより腫瘍細胞に細胞死を誘導させる作用を発揮させることをいい、対象となる腫瘍細胞は、培養細胞であっても、個体内の細胞であってもよい。なお、前記個体としては、例えば、ヒトであ

ってもよいし、ヒト以外のマウス、ラット、ブタなどの脊椎動物であってもよい。

【発明の効果】

【0023】

本発明によれば、 β 1インテグリン活性化作用を有するペプチド、ポリヌクレオチド、組換えベクター、細胞、及びウイルス、並びに、これらを有効成分として含有する、 β 1インテグリンを活性化する薬剤、 β 1インテグリンを活性化することにより、細胞外マトリックスに対する細胞接着を増強する薬剤、傷修復剤、脂肪細胞分化抑制剤、肥満予防剤、肥満抑制剤、細胞死誘導剤、及び抗腫瘍剤、並びに、多量体フィブロネクチンを有効成分として含有する細胞死誘導剤及び抗腫瘍剤等を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

以下、上記知見に基づき完成した本発明の実施の形態を、実施例を挙げながら詳細に説明する。実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Ltd.などの標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いている場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコールを用いる。

【0025】

なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的な実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

【0026】

==本発明に係るペプチドの薬理作用==

上述のTNIIIA2的作用を増強させるため、2つのペプチド鎖がジスルフィド結合で結合できるように、TNIIIA2のC末端にシステイン(C)を付加して作製したペプチド(配列番号9)において、14番目のチロシン(Y)をアラニン(A)に、15番目のスレオニン(T)をアラニン(A)に、17番目のスレオニン(T)をアラニン(A)に、19番目のアルギニン(R)をアラニン(A)に、20番目のグリシン(G)からアラニン(A)に、9番目のリジン(K)及び19番目のアルギニン(R)をアルギニン(R)及びリジン(K)に、それぞれ置換したペプチド(配列番号10～15参照)は、システインを付加したTNIIIA2と同様に β 1インテグリンを活性化する作用を有するが、16番目のイソロイシン(I)をアラニン(A)に、18番目のイソロイシン(I)をアラニン(A)に、21番目のバリン(V)をアラニン(A)に、19番目のアルギニン(R)をグルタミン酸(E)に、9番目のリジン(K)をグルタミン酸(E)に、それぞれ置換したペプチド(配列番号16～20参照)は、 β 1インテグリンを活性化する作用を有していない。

【0027】

以上のことから、TNIIIA2のアミノ酸配列において、少なくとも9、14、15、16、17、18、19、20、及び21番目のアミノ酸がそれぞれ、塩基性アミノ酸、チロシン又はアラニン、スレオニン又はアラニン、イソロイシン、スレオニン又はアラニン、イソロイシン、塩基性アミノ酸又はアラニン、グリシン又はアラニン、バリンであることが、 β 1インテグリンの活性化に重要であることが示された。従って、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチドを細胞に作用させることにより、細胞膜における β 1

インテグリンを活性化し、細胞外マトリックス (ECM) に対する細胞接着を増強することができる。なお、作用させる細胞は、培養細胞であっても、個体内の細胞であってもよい。前記個体は、例えば、ヒトであってもよいし、ヒト以外のマウス、ラット、ブタなどの脊椎動物であってもよい。

【0028】

また、上述のような作用を有することから、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチドは、 $\beta 1$ インテグリンの活性化、及び、 $\beta 1$ インテグリンを介した、細胞外マトリックス (ECM) に対する細胞接着の増強に有用である他、TNFIIA2と同様に、細胞伸展の促進、外傷の修復 (例えば、創傷の治癒、術後組織の修復など)、脂肪細胞の分化抑制、肥満の予防・抑制、がん治療、感染症治療、骨髄抑制等の免疫抑制状態の治療、エリスロジェネシス (赤血球生成) などにも有用である。

【0029】

さらに、TNFIIA2は、実施例2及び3に示すように、浮遊性腫瘍細胞に対して細胞死を誘導する作用を有すること、及び、インテグリン結合配列 (Arg-Gly-Asp: RGD) を有する(RGD)₆又はフィブロネクチン (特に多量体フィブロネクチン) などと一緒に浮遊性腫瘍細胞に対して作用させることにより、浮遊性腫瘍細胞に細胞死を効率よく誘導できることが明らかになった。従って、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチドも、TNFIIA2と同様に、浮遊性腫瘍細胞に細胞死を誘導する作用を有し、Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を有するペプチドと一緒に浮遊性腫瘍細胞に作用させることにより、浮遊性腫瘍細胞に細胞死を効率よく誘導することができる。

【0030】

そこで、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチドは、浮遊性腫瘍細胞に対する細胞死誘導剤、浮遊性腫瘍細胞に起因する腫瘍に対する抗腫瘍剤等として有用である。

【0031】

なお、本明細書において、通常状態で浮遊している悪性の細胞群をいい、分化の程度を異にするすべての白血病細胞、リンパ腫細胞等を挙げることができる。また生体内及び初期培養細胞に限らず、各種の細胞株であってもよく、このような細胞株としては、U937、HL60、NaIm-6、Ramos、LY5178Y-ML25及びK562などの白血病細胞株を挙げることができる。

【0032】

ここで、上述の配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチドとしては、 $\beta 1$ インテグリンを活性化する作用を有するものであれば特に制限されるものではなく、例えば、配列番号3～8に示されるアミノ酸配列からなるペプチド、タグ (例えば、Hisタグ、GSTタグなど) が結合した、配列番号3～8に示されるアミノ酸配列を有するペプチド、これらのペプチドの作用を増強させるために、2つのペプチド鎖がジスルフィド結合で結合できるようにペプチドのC末端にシステイン (C) を付加したペプチド (例えば、配列番号10～15に示されるアミノ酸配列からなるペプチド)、上述のアミノ酸配列を繰り返し有するペプチド等であってもよい。

【0033】

==本発明に係るペプチドの製造方法==

本発明に係るペプチドは、その配列情報に基づいて有機化学的に合成することができる。また、適切なエンハンサー/プロモーターをもつ発現ベクターに、本発明に係るペプチドをコードするポリヌクレオチドを挿入した組換えベクターを用いてもよい。組換えベクターがプラスミドの場合、この組換えベクターを大腸菌、サルモネラ菌等の菌や、イースト、動物細胞などに導入し、発現させ、生成したペプチドを、常法を用いて精製することができる。また、この組換えベクターをin vitroで転写させて得られたmRNAを、ウサギ網状赤血球抽出液、大腸菌S30抽出液、麦芽抽出液、小麦胚抽出液などを用いたインビトロ翻訳システムにより翻訳させて、合成されたペプチドを精製してもよい。組換えベクターがファージDNAやウイルスDNAの場合、適切な宿主細胞に感染させ、合成されたペ

プチドを精製してもよい。

【0034】

ここで、発現ベクターを作製する際、Hisタグ、GSTタグなどのタグをコードするポリヌクレオチドと、本発明に係るペプチドをコードするポリヌクレオチドとを融合した融合ポリヌクレオチドをベクターに挿入し、融合タンパク質として発現させるのがより好ましい。タグを利用して、目的のペプチドを容易に精製することが可能になるからである。なお、タグは、最終段階で除去し、HPLC (high-performance(-speed) liquid chromatography) などで本発明に係るペプチドだけを精製することもできる。

【0035】

なお、本発明に係るペプチドを細胞外に分泌させるため、シグナルペプチドを付加してもよく、そのような融合ペプチドを発現することのできる組換えベクターは、上述のように、適切なエンハンサー／プロモーターをもつ発現ベクターに、シグナルペプチドを有する融合ペプチドをコードするポリヌクレオチドを挿入することで作製することができる。

【0036】

また、前記組換えベクターを含有する細胞（組換え細胞）は、例えば、動物細胞に、前記組換えベクターをエレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、又はカルシウムを用いたトランスフェクション法等によって導入することにより作製できる。

【0037】

==多量体フィブロネクチンの薬理作用==

多量体フィブロネクチンは、実施例2に示すように、浮遊性腫瘍細胞に対して細胞死を誘導する作用を有する。このことから、多量体フィブロネクチンは、浮遊性腫瘍細胞に対する細胞死誘導剤、浮遊性腫瘍細胞に起因する腫瘍に対する抗腫瘍剤等として有用である。

【0038】

なお、多量体フィブロネクチンは、例えば、ジチオスレイトールで還元したフィブロネクチン同士をジスルフィド結合で結合することにより作製してもよいし、KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) やBSA (Bovine Serum Albumin) 等に複数のフィブロネクチンをコンジュゲートすることにより作製してもよいし、MAP (Multiple Antigenic Peptide) 法により多量体フィブロネクチンを作製してもよい。

【0039】

==本発明に係る薬剤について==

本発明に係るペプチドは、上述のように、 $\beta 1$ インテグリンの活性化、及び、 $\beta 1$ インテグリンを介した、細胞外マトリックス (ECM) に対する細胞接着の増強、外傷の修復、脂肪細胞の分化抑制、肥満の予防・抑制等に有用であることから、 $\beta 1$ インテグリン活性化剤、細胞接着増強剤、外傷修復剤、脂肪細胞分化抑制剤、肥満予防剤、肥満抑制剤、浮遊性腫瘍細胞に対する細胞死誘導剤、及び浮遊性腫瘍細胞に起因する腫瘍に対する抗腫瘍剤等の薬剤として用いることができる。

【0040】

また、本発明に係るペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びその塩基配列に相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、並びに、これらのポリヌクレオチドを有する組換えベクター、並びに、この組換えベクターが導入され、本発明に係るペプチドを分泌する細胞、及び、細胞に感染することにより本発明に係るペプチドを該細胞に分泌させるウイルス等も、 $\beta 1$ インテグリンの活性化、及び、 $\beta 1$ インテグリンを介した、細胞外マトリックス (ECM) に対する細胞接着の増強、外傷の修復、脂肪細胞の分化抑制、肥満の予防・抑制等に有用であり、上述の薬剤として用いてもよい。なお、ウイルスを薬剤として用いる場合には、毒性や副作用が生じないようにするために、ウイルスを遺伝子操作等の公知の方法により、増殖しないように変異させておくことが好ましい。例えば、感染はするが、複製しないように改変されたレトロウイルスやアデノウイルスに、本発明に係るペプチドを発現することができる組換えベクターを組み込んだものを用いればよい。

【0041】

また、本発明に係るペプチド、又は、それをコードするポリヌクレオチド、若しくはその塩基配列に相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドを封入したリボソームも上述の薬剤として有用である。この場合、Trans IT In Vivo Gene Delivery System (TaKaRaの商品名) などを用いることにより、生体内標的部位にこれらのペプチドやポリヌクレオチドを導入することができる。

【0042】

さらに、上記ペプチドやポリヌクレオチドなどを内包した高分子ミセルも、薬物キャリアとして優れた特性を有し、上述の薬剤として有用である。

【0043】

また、本発明に係るペプチドを細胞に発現させるためのプラスミドと、高分子キャリアとの複合体も、標的組織にプラスミドを運び、そこでペプチドを発現させることが可能であることから、上述の薬剤として有用である。なお、高分子キャリアとしては、前記プラスミドを細胞内に導入することが可能な物質であればどのようなものを用いてもよく、例えば、ポリリジン、ポリエチレンジイミン、ポリタミン、キトサン、合成ペプチド、又はデンドリマーなどを用いることができる。

【0044】

さらに、本発明に係るペプチドとタンパク質キャリアとの複合体、及び本発明に係るペプチドを含むMAP (Multiple Antigenic Peptide) 等も上述の薬剤として有用である。なお、タンパク質キャリアとしては、例えば、KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)、BSA (Bovine Serum Albumin)、OVA (Ovalbumin)、HSA (Human Serum Albumin) などを用いることができる。

【0045】

なお、本発明に係る、 β 1インテグリン活性化剤、細胞接着増強剤、外傷修復剤、脂肪細胞分化抑制剤、肥満予防剤、肥満抑制剤、浮遊性腫瘍細胞に対する細胞死誘導剤、及び浮遊性腫瘍細胞に起因する腫瘍に対する抗腫瘍剤等の薬剤は、上述の本発明に係るペプチドを2種以上含んでも構わないし、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するペプチド（例えば、TNIIIA2、配列番号9に示されるアミノ酸配列を有するペプチドなど）を含んでも構わない。

【0046】

また、本発明に係る浮遊性腫瘍細胞に対する細胞死誘導剤、及び浮遊性腫瘍細胞に起因する腫瘍に対する抗腫瘍剤等の薬剤においては、その効能を高めるために、例えば、配列番号21に示されるアミノ酸配列を有するペプチド、このアミノ酸配列を繰り返す有するペプチド、(RGD)₂等のArg-Gly-Asp (RGD) 配列を有するペプチド（但し、細胞接着活性を示すものに限る。）、細胞外マトリックスなどを併用してもよいし、上述の薬剤にさらに含めて使用してもよい。なお、併用する場合には、腫瘍細胞に対して一緒に作用させてもよいし、別々に作用させてもよい。

【0047】

前記細胞外マトリックス (Extracellular Matrix: ECM) としては、インテグリン結合部位 (RGD配列) を有し、細胞接着活性を示すものであれば特に制限されるものではなく、例えば、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、フィブリノゲン、フォンビルブランド因子、エンタクチン、I型コラーゲン、ネトリン、粘菌のディスコイディンI、大腸菌の λ 受容体タンパク質など、あるいは、これらのタンパク質を2以上組み合わせたもの、あるいは、これらのタンパク質を、例えば、ジスルフィド結合で結合したり、KLHやBSA等にコンジュゲートしたり、MAP (Multiple Antigenic Peptide) 法を行ったりして多量体化したものを用いることができる。

【0048】

なお、上述の薬剤は、使用する部位又は目的に応じて、薬理学的に許容された適切な賦形剤や基剤などの、従来使用されている製剤添加物をさらに含有することとしてもよい。

【0049】

また、本発明に係る薬剤を、ヒトまたはヒト以外の脊椎動物に対して投与する場合には、例えば、患部、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内等の注射による投与、経口投与、塗布や貼付等による非経口投与などの方法を用いることができる。

【実施例】

【0050】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、これに限定されるものではない。また、実施例中の％は、特に断らない限り、重量（質量）基準である。

【0051】

【実施例1】

TNIIIA2は、 β 1インテグリンを活性化する作用、脂肪細胞の分化を抑制する作用等を有する。そこで、TNIIIA2のどのアミノ酸がこれらの作用に必須か、あるいは、必須でないかを調べるため、様々な変異がTNIIIA2の活性を失わせるかどうか、 β 1インテグリンの活性化を指標にして調べた。

【0052】

1mLの血清を含まないDMEM培地に懸濁したWI38VA13細胞（ $1\sim 5\times 10^6$ cells/mL）を表1に示す各種ペプチドを終濃度で50 μ g/mLとなるように混合し、活性型 β 1インテグリン特異的エпитープを認識するAG89抗体（MBL社製；終濃度で1 \sim 5 μ g/mL）を添加して室温で30分間インキュベートした。なお、コントロールとしてペプチドを添加しないで同様にインキュベートしたものを用いた。

【0053】

その後、FITC標識抗マウスIgG（Jackson Immuno Laboratories；終濃度で1 μ g/mL）を添加して室温で30分間インキュベートした後、細胞をPBS(-)溶液で洗浄し、フローサイトメトリー分析（FACS Calibur及びFACS Aria：Becton Dickinson；Cytoron：Ortho Diagnostics）により蛍光強度（MFI：mean fluorescence intensity）を測定し、細胞における β 1インテグリンの活性化（TNIIIA2活性）を評価した。

【0054】

その結果を表1及び図1に示す。

【表1】

ペプチド	配列(配列番号)	β 1インテグリン 活性化作用
TNIIIA2	RSTDLPGLKAATHYTITIRGVC (配列番号9)	++
Y14A	RSTDLPGLKAATHATITIRGVC (配列番号10)	++
T15A	RSTDLPGLKAATHYAITIRGVC (配列番号11)	+++
I16A	RSTDLPGLKAATHYTATIRGVC (配列番号16)	—
T17A	RSTDLPGLKAATHYTIAIRGVC (配列番号12)	+
I18A	RSTDLPGLKAATHYTITARGVC (配列番号17)	—
R19A	RSTDLPGLKAATHYTITIAGVC (配列番号13)	++
G20A	RSTDLPGLKAATHYTITIRAVC (配列番号14)	+++
V21A	RSTDLPGLKAATHYTITIRGAC (配列番号18)	—
R19E	RSTDLPGLKAATHYTITIEGVC (配列番号19)	—
K9E	RSTDLPGLEAATHYTITIRGVC (配列番号20)	—
K9R19K	RSTDLPGLRAATHYTITIKGVC (配列番号15)	++

【0055】

表1及び図1に示すように、C末端にシステインを付加したTNIIIA2のアミノ酸配列において、14番目のチロシン(Y)をアラニン(A)に置換した変異ペプチド(Y14A)、15番目のスレオニン(T)をアラニン(A)に置換した変異ペプチド(T15A)、17番目のスレオニン(T)をアラニン(A)に置換した変異ペプチド(T17A)、19番目のアルギニン(R)をアラニン(A)に置換した変異ペプチド(R19A)、20番目のグリシン(G)からアラニン(A)に置換した変異ペプチド(G20A)、9番目のリジン(K)及び19番目のアルギニン(R)をアルギニン(R)及びリジン(K)に置換した変異ペプチド(K9R19K)は、それぞれC末端にシステインを付加したTNIIIA2と同様に β 1インテグリンを活性化作用を有することが明らかになった。特に、T15AとG20Aの変異ペプチドは、TNIIIA2に比べて β 1インテグリンを活性化作用が強いことがわかった。

【0056】

一方、C末端にシステインを付加したTNIIIA2のアミノ酸配列において、16番目のイソロイシン(I)をアラニン(A)に置換した変異ペプチド(I16A)、18番目のイソロイシン(I)をアラニン(A)に置換した変異ペプチド(I18A)、21番目のバリン(V)をアラニン(A)に置換した変異ペプチド(V21A)、19番目のアルギニン(R)をグルタミン酸(E)に置換した変異ペプチド(R19E)、9番目のリジン(K)をグルタミン酸(E)に置換した変異ペプチド(K9E)は、 β 1インテグリンを活性化できないことが

わかった。

【0057】

従って、TNIIIA2の9番目のアミノ酸のアルギニン(R)への変異、19番目のアミノ酸のリジン(K)への変異、並びに、14、15、17、19、及び20番目のアミノ酸のアラニン(A)への変異は、TNIIIA2の活性を失わせないことがわかった。

【0058】

〔実施例2〕

次に、浮遊性腫瘍細胞における β 1インテグリンを活性化させ、細胞外マトリックスに接着させることにより、浮遊性腫瘍細胞に対して細胞死を誘導できるかどうかを調べた。なお、活性化した β 1インテグリンの接着性を高めるために、多量体フィブロネクチン(多量体FN)を準備した。多量体フィブロネクチンは、ヒト由来血漿性フィブロネクチンのI型及びII型リピード内にある分子内ジスルフィド結合を、ジチオスレイトールで還元して、分子間ジスルフィド結合を形成させることにより作製した。多量体FNが得られたかどうかの確認は、通常2量体で存在するフィブロネクチンの分子量より大きいかどうかを電気泳動法により調べることにより行った。

【0059】

まず、細胞培養用96穴マイクロプレート(旭テクノグラス社製)の各ウェルに、無血清培地に懸濁したヒト悪性Bリンパ腫細胞Ramos(1×10^5 細胞/200 μ l/ウェル)を添加し、さらに、最終濃度で100 μ g/mlになるようにヒト由来血漿性フィブロネクチン(FN)または多量体FNを、最終濃度で25, 50, 又は75 μ g/mlになるようにTNIIIA2を加えた後、試料中のタンパク質濃度が全て最終300 μ g/mlになるようにBSAを添加して補正し、37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 インキュベータにて2日間培養した。なお、TNIIIA2及びBSAを添加しないでFNまたは多量体FNを添加して培養したものを準備した。

【0060】

培養後、Cell Counting Kit(和光純薬工業社製)を用いて生存細胞数を測定した。なお、細胞生存率は、BSAでコートしたウェルに、TNIIIA2を添加していない無血清培地を添加して培養した場合の生存細胞数を100%として算出した。その結果を図2Aに示す。

【0061】

また、上述と同様に、最終濃度で25, 50, 75, 若しくは100 μ g/mlになるように多量体FNを、最終濃度で50 μ g/mlになるようにTNIIIA2を各ウェルにそれぞれ添加して赤白血病細胞株TSA-8を培養し、多量体FNを添加しないでTNIIIA2を添加して培養した場合の生存細胞数を100%として細胞生存率を算出した。なお、コントロールとして、最終濃度で25, 50, 75, 又は100 μ g/mlとなるように多量体FNを各ウェルにそれぞれ添加して赤白血病細胞株TSA-8を培養したものを準備し、多量体FN及びTNIIIA2を添加しないで培養した場合の生存細胞数を100%として細胞生存率を算出した。その結果を図2Bに示す。

【0062】

図2A及び図2Bに示すように、TNIIIA2をフィブロネクチンと一緒に浮遊性腫瘍細胞に作用させると細胞死を誘導できることがわかった。また、TNIIIA2の濃度に依存して細胞死の誘導が促進されることがわかった。さらに、多量体FNを単独で浮遊性腫瘍細胞に作用させても細胞死を誘導できるが、TNIIIA2と併用することにより効率よく細胞死を誘導できることがわかった。

【0063】

〔実施例3〕

次に、フィブロネクチンのインテグリン結合部位であるRGD配列を有するペプチドを、TNIIIA2と一緒に浮遊性腫瘍細胞に作用させることにより細胞死を誘導できるかどうか調べた。

【0064】

まず、RGDペプチド(GRGDSP: 配列番号21参照)を8分子構形に結合したMAP((RGD)₈)を、Fmoc合成法に準じてペプチドシンセサイザーにより調製した。ま

た、ネガティブコントロールとして、RGEペプチド (GRGESP: 配列番号22参照) を8分子構形に結合したMAP ((RGD)₈) を同様に調製した。

【0065】

次に、実施例2に記載の方法と同様に、接着基質をコートした96穴マイクロプレートの各ウェルに、上述の無血清培地に懸濁した急性骨髄性 (単球系) 白血病細胞株U937 ($1 \times 10^4 \sim 5$ 細胞/200 μ l/ウェル) を添加し、さらに、(RGD)₈ (最終濃度で50 μ g/ml)、(RGE)₈ (最終濃度で50 μ g/ml)、TNIIIA2 (最終濃度で25又は50 μ g/ml)、又は、TNIIIA2 (最終濃度で25 μ g/ml) 及び(RGD)₈ (最終濃度で50 μ g/ml) 若しくは(RGE)₈ (最終濃度で50 μ g/ml) を添加して37°C、5% CO₂ インキュベータにて2日間培養した。また、コントロールとして、(RGD)₈、(RGE)₈、及びTNIIIA2を添加しないで培養したものを準備した。

【0066】

培養後、Cell Counting Kitを用いて生存細胞数を測定し、コントロールでの生存細胞数を100%として細胞生存率を算出した。その結果を図3に示す。

【0067】

図3に示すように、TNIIIA2だけでも浮遊性腫瘍細胞に対して細胞死を誘導でき、TNIIIA2と(RGD)₈ とを併用することにより、より効率よく細胞死を誘導できることが明らかになった。このことから、インテグリン結合部位であるRGD配列を有するペプチドをTNIIIA2と一緒に浮遊性腫瘍細胞に作用させることによりより効率よく細胞死を誘導できることが示された。

【0068】

以上のことから、浮遊性腫瘍細胞は、TNIIIA2単独により、あるいは、TNIIIA2と、インテグリン結合部位であるRGD配列を有するペプチドや細胞外マトリックス (例えば、フィブロネクチン (FN) など)、又はこれらを多量体化したものとの併用により、細胞死が誘導されることが明らかになった。

【図面の簡単な説明】

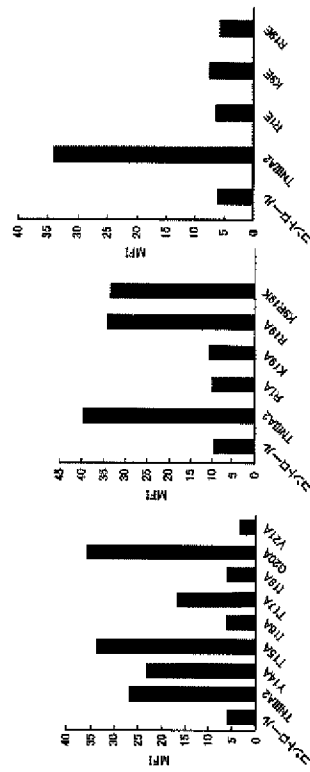
【0069】

【図1】本発明の一実施例において、各種ペプチドが β 1インテグリンを活性化するかどうかを調べた結果を示す図である。

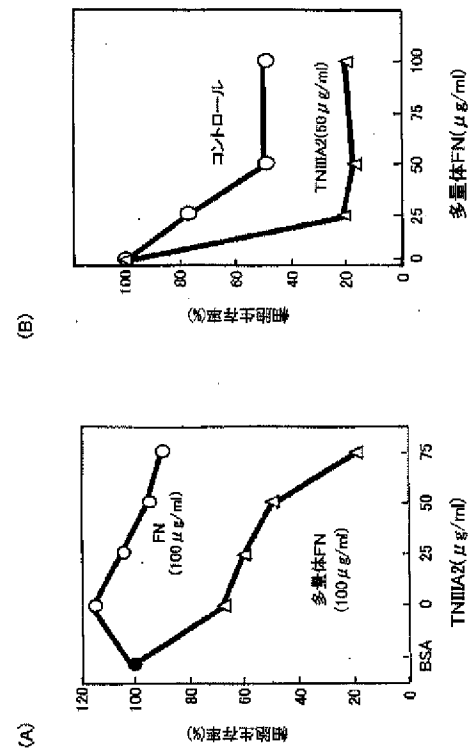
【図2】本発明の一実施例において、TNIIIA2とFNあるいは多量体FNとを用いた場合に細胞死が誘導されるかどうかを調べた結果を示す図である。

【図3】本発明の一実施例において、TNIIIA2、(RGE)₈、(RGD)₈、又は、TNIIIA2及び(RGE)₈若しくは(RGD)₈の浮遊性腫瘍細胞に対する細胞死誘導作用を調べた結果を示す図である。

【図1】



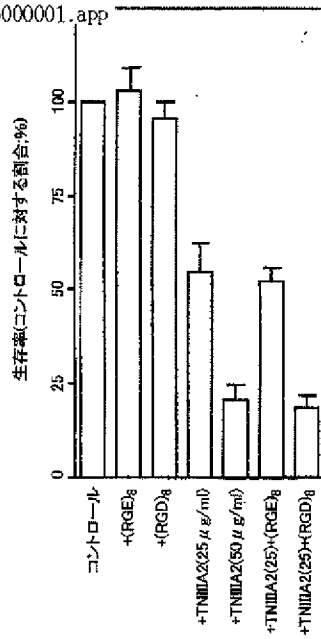
【図2】



【図3】

【配列表】

2008067616000001.app



(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02		
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/04		
A 6 1 K	38/17	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	A 6 1 K	37/12		
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 0 7 K	14/47		
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/15		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	7/00	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A	
			C 1 2 N	7/00		

Fターム(参考) 4C087 BC83 CA12 NA14 ZA70 ZA89 ZB21 ZB22 ZB26
 4H045 AA10 AA30 BA17 CA40 EA28 FA33 FA74